



電気化学的細胞脱離のための表面設計

著者	掛川 貴弘
発行年	2015
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2014
報告番号	12102甲第7237号
URL	http://hdl.handle.net/2241/00125826

氏 名（本 籍 地）	掛 川 貴 弘
学 位 の 種 類	博 士（工 学）
学 位 記 番 号	博 甲 第 7237 号
学位授与年月日	平成 27 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審 査 研 究 科	数理解物質科学研究科
学 位 論 文 題 目	電気化学的細胞脱離のための表面設計

主	査	筑波大学教授	博士(工学)	鈴木 博章
副	査	筑波大学教授	工学博士	長崎 幸夫
副	査	筑波大学教授	博士(工学)	陳 国平
副	査	筑波大学准教授	博士(理学)	山本 洋平
副	査	横浜国立大学准教授	博士(工学)	福田 淳二

論 文 の 要 旨

第1章では、本研究の背景として、従来の臓器移植や人工臓器に変わる新しい治療法としての再生医療について、その社会的意義と注目される組織工学的アプローチについて述べている。組織工学的アプローチとして、生体足場材料を利用し、皮膚や骨などの生体内でも比較的単純な組織が構築可能となってきたものの、心筋や肝組織などのような組織特有の特性が重要となる多くの組織や臓器の構築は困難である状況を述べている。この問題を解決するためには、生体足場材料ではなく、細胞のみからなる生体類似組織を生体外で構築するという手法が有用であり、これを実現するために不可欠な組織回収技術について過去の研究例を挙げている。研究例の1つである電気化学的な細胞回収法には、安全性や残存細胞といった問題点があり、これらを克服し、安全かつ確実な細胞脱離技術の開発を本研究の目的としたことが述べられている。

第2章では、設計した細胞非接着性オリゴペプチド(配列: CGGGKEKEKEK)の修飾により、代表的な糖タンパクであるフィブロネクチンやフィブリノーゲンの吸着が未修飾表面と比較して90%程度まで抑制できることを示している。さらに、2種類のオリゴペプチドを混合して修飾した表面において、細胞接着性オリゴペプチドの割合が0.1%以上の表面では、細胞が良好に接着・伸展し、増殖するのに対し、0.01%以下の表面においては細胞の初期接着は抑制され、増殖率も低いことを示している。細胞接着性ペプチド(配列: CGGGKEKEKEKGRGDSP)修飾表面で細胞を培養し、金表面に負電位を印加することで基板上のマウス線維芽細胞を脱離可能であること、また、ヒト間葉系幹細胞シートの回収が可能であることを示している。

第3章では、より確実な細胞脱離技術の確立を目指し、自己組織化ペプチドの配列をより詳細に検討した結果が述べられている。自己組織化ペプチドを金表面に結合するためのアンカー、表面との相互作用

用を遠ざけるためのリンカー、自己組織化に関わる両性イオン部分に分けてデザインし、リンカー、両性イオン配列の種々の組み合わせからタンパク質の非特異吸着を抑制可能なペプチド配列として、CPPPKKEKEKEKEK を新たに見出した。この細胞非接着性ペプチドの修飾により、タンパク質の非特異吸着、細胞接着を抑制可能であり、電気化学的細胞脱離に有用である可能性を示している。

第4章では、第3章で設計した細胞非接着性ペプチドの末端に細胞接着配列 RGD を付与した細胞接着性ペプチド(配列: CPPPKKEKEKEKEKGRGDSP)を用いて電気化学的細胞脱離の評価を行い、この細胞接着性ペプチドを修飾した基板上で培養したヒト線維芽細胞を金表面への負電位の印加により脱離させられることが述べられている。さらに、表面の凹凸構造を加えることでヒト線維芽細胞をコラーゲンゲルへ確実かつ迅速に転写可能であることが示されている。

第5章では以上の内容が総括されている。

審 査 の 要 旨

〔批評〕

本論文は、接着細胞を電気化学的な反応を利用して迅速に脱離するための培養表面設計に関するものである。本論文では、金電極の表面に金—チオール結合を介して結合し密な自己組織化単分子膜を形成するオリゴペプチドのデザインについて記述されている。このデザインでは、プラスおよびマイナスにチャージしたアミノ酸を交互に配置することで、隣接する分子間で静電的な引力が生じるようにアミノ酸配列が工夫されている。このオリゴペプチドを修飾した表面では、タンパク質の非特異吸着が極端に抑制されることが示されているが、これは、このオリゴペプチドが密な分子層を形成し、金電極が表面に露出していないことを示唆しており、目的の表面が作製できている根拠となっている。

このペプチドの末端にさらに細胞接着アミノ酸配列を追加することで、細胞の金表面へ直接接着を防ぎながら、金表面にオリゴペプチドを介して細胞を接着させることを実現している。このことは、このオリゴペプチド層を電気化学的に還元脱離させ、同時に、接着した細胞を脱離させるという本論文の目的達成において必須の条件であった。詳細な実験データとして、設計したオリゴペプチドの金表面への吸着量の定量、細胞接着配列の混合率と接着細胞数の関係、ペプチド修飾表面における細胞増殖速度などを評価しており、いずれも設計の正しさが示唆される結果である。また、細胞接着性ペプチドを修飾した表面に細胞を接着させ、電位印加時間と脱離細胞数の関係を示し、迅速に細胞脱離が可能であることを実証しているが、このようなオリゴペプチドを用いた電気化学的細胞脱離は従来の研究には見られなかった興味深い斬新なアイデアであり、高く評価できる。

以上の結果より本論文の目的は概ね達成されていると思われるが、さらに確実かつ迅速な細胞脱離技術の確立を目指し、分子動力学計算と実験を組み合わせた検討を行っている。具体的には、自己組織化オリゴペプチドを金表面に結合するためのアンカー配列、表面との相互作用を打ち消すリンカー配列、自己組織化に関わる両性イオン配列に分け、リンカーと両性イオン配列の種々の組み合わせからタンパク質の非特異吸着を抑制可能なペプチド配列を新たに見出している。このペプチドに関して、同様に金表面への吸着量、タンパク質の非特異吸着抑制、さらには細胞マイクロパターンニングなどの評価を行い、こ

のペプチド配列が有用であることを示している。また、表面のマイクロナノ微細加工によって、細胞シートなどの2次元的に細胞同士が接着した組織体であっても、この電気化学的細胞脱離が利用可能であることも示した。

以上のように、電気化学細胞脱離をオリゴペプチドのアミノ酸配列を工夫することで実現できたことは、この分野に於いても画期的であり、今後の研究に一つの方向性・可能性を示すことができたのではないかとと思われる。

〔最終試験結果〕

平成27年2月16日、数理物質科学研究科学位論文審査委員会において審査委員の全員出席のもと、著者に論文について説明を求め、関連事項につき質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって、合格と判定された。

〔結論〕

上記の論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、著者は博士(工学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。